

DOCKET NO.: 258409US0X PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Jean BERTHIER, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/00920

INTERNATIONAL FILING DATE: March 24, 2003

FOR: METHOD FOR THE CONCENTRATION OF MACROMOLECULES OR  
AGGLOMERATES OF MOLECULES OR OF PARTICLES

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

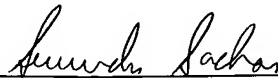
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
France	02 03690	25 March 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/00920. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number

**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

BREVATOME

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

3, rue du Docteur Lancereaux  
GUERRE, Fabien  
c/o BREVATOME  
3, rue du Docteur Lancereaux  
F-75008 PARIS  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 juillet 2003 (17.07.03)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 14051.3 FG	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR03/00920	Date du dépôt international (jour/mois/année) 24 mars 2003 (24.03.03)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 25 mars 2002 (25.03.02)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc	

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un astérisque(\*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Date de prioritéDemande de priorité n°Pays, office régional ou  
office récepteur selon le PCTDate de réception du  
document de priorité

25 mars 2002 (25.03.02) 02/3690

FR

07 juil 2003 (07.07.03)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé:

David LANIEL (Fax 338-87-20)

no de télécopieur: (41-22) 338.71.40

no de téléphone: (41-22) 338 8773

16150732f



REC'D 07 JUL 2003	
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 JUIN 2003

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

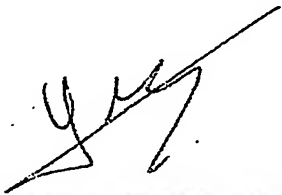

N° 11354\*01

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>25 MARS 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0203690</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>25 MARS 2002</b> PAR L'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  BREVATOME 3 rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) B14051.3/FG DD2319/CNRS			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen . Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/> N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  PROCEDE DE CONCENTRATION DE MACROMOLECULES OU AGGLOMERATS DE MOLECULES OU PARTICULES.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date Pays ou organisation Date Pays ou organisation Date <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public de caractère Scientifique, Technique et Industriel	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	31-33 rue de la Fédération	
	Code postal et ville	75752	PARIS 15ème
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE <b>25 MARS 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0203690</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI		DB 540 W / 260699	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>			B14051.3/FG DD2319/CNRS		
<b>6 MANDATAIRE</b>					
Nom		GUERRE			
Prénom		Fabien			
Cabinet ou Société		BREVATOME 422.5/S002			
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		7068 du 12.06.98			
Adresse	Rue	3 rue du Docteur Lancereaux			
	Code postal et ville	75008	PARIS		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.53.83.94.00			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.63.83.33			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		brevets.patents@brevaalex.com			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>					
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>			
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>			Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non			
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>			<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  F.GUERRE 422-5 S/002			<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  		

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
Page suite N° 1.../1..

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>25 MARS 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0203690</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>B14051.3/FG</b>			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N°	
<b>5 DEMANDEUR</b>			
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	3 rue Michel Ange	
	Code postal et ville	75794	PARIS CEDEX 16
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>5 DEMANDEUR</b>			
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Pays			
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) <b>F.GUERRE 422.5/S002</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE</b> <b>OU DE L'INPI</b>	

PROCEDE DE CONCENTRATION DE MACROMOLECULES OU  
AGGLOMERATS DE MOLECULES OU PARTICULES  
DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE

5                   La présente invention a trait à un procédé de concentration de macromolécules ou agglomérats de molécules ou particules, en vue d'une éventuelle détection ou d'une extraction spécifique desdites macromolécules ou desdits agglomérats.

10   **ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE**

                  Actuellement, les techniques de concentration de macromolécules ou agglomérats de molécules sont, pour la plupart, destinées au domaine du diagnostic médical, notamment au domaine de la  
15 détection de brins d'ADN ou de complexes protéiniques tels que les prions.

                  Pour la détection de brins d'ADN, la technique actuelle consiste, le plus souvent, à concentrer des brins d'ADN par amplification dans un  
20 milieu liquide, selon la technique communément désignée par l'abréviation PCR (« Polymerase Chain Reaction » ou « Réaction en Chaîne par Polymérase »).

                  Cette technique consiste à répliquer les brins d'ADN d'un échantillon liquide un grand nombre de  
25 fois (jusqu'à  $10^5$ - $10^6$  fois) en injectant de la polymérase dans l'échantillon soumis à une série de cycles thermiques.

                  Après un nombre de cycles thermiques assez  
30 important, en tout cas supérieur à 10, la concentration

en ADN est suffisamment importante pour permettre la détection.

Toutefois, cette technique, telle qu'explicitée ci-dessus, nécessite une durée importante, du fait du nombre conséquent de cycles thermiques à reproduire pour avoir une quantité d'ADN suffisante. De plus, cette technique s'accompagne d'un bruit de fond important du fait que la polymérase peut amplifier des segments d'ADN présents dans l'échantillon liquide, qui sont de nature différente des segments d'ADN à détecter.

Afin de pallier ces inconvénients, des méthodes alternatives à la PCR ont été développées. Parmi ces méthodes, on peut citer une méthode ne nécessitant pas d'amplification. Le principe de cette méthode de détection sans amplification repose sur la capture des segments d'ADN cibles aussi peu nombreux soient-ils. Elle consiste à hybrider les segments d'ADN cibles avec des nanobilles paramagnétiques fonctionnalisées de manière à concentrer lesdits segments à la surface de ces billes avant détection. Cette méthode se heurte toutefois au problème de l'adsorption non spécifique, certaines billes paramagnétiques, enrobées de latex, se collant aux parois solides du réacteur, au niveau duquel est mise en œuvre la méthode, sous l'effet de l'hydrophobie ou des forces électriques. La sensibilité atteinte n'est alors plus celle escomptée.

En ce qui concerne les complexes protéiniques tels que les prions, ceux-ci doivent



également, pour être détectables, dans des liquides physiologiques, tels que le sang, subir une phase de concentration. Pour ces molécules, la technique PCR précédemment décrite est inutilisable, parce qu'ils ne contiennent pas de nucléotides. De ce fait, des recherches relatives au domaine des prions ont abouti récemment à la mise en place d'une méthode dite 'méthode d'amplification des protéines anormalement repliées' ou PMCA (pour 'Protein Misfolding Cyclic Amplification').

Les prions, responsables notamment des encéphalopathies spongiformes, sont des complexes ou agglomérats constitués d'une protéine naturelle, la glycoprotéine  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , normalement présente à la surface de nombreuses cellules dans l'organisme et d'une protéine infectieuse  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , qui ne se différencie de la glycoprotéine normale  $\text{PrP}^{\text{C}}$  que par sa conformation, qui est anormalement repliée. Les protéines  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sont aptes, d'une part, à s'associer aux protéines  $\text{PrP}^{\text{C}}$  et d'autre part, aptes à induire la transformation de protéines normales en protéines infectieuses. La détection des prions est rendue difficile par le fait qu'ils ne sont présents en quantité notable que dans le cerveau, alors qu'ils se retrouvent à l'état de traces dans le sang.

La technique PMCA permet ainsi de concentrer les prions dans le milieu de prélèvement, afin qu'ils puissent être détectés.

Pour ce faire, un procédé de sonication destiné à fragmenter les prions est mis en œuvre. Tous les prions issus de cette fragmentation par ultra-sons,

repoussent in-vitro à l'aide des protéines PrP<sup>C</sup> de l'échantillon. Ce cycle élémentaire (fragmentation-repousse) est reproduit autant de fois que nécessaire, jusqu'à ce que la quantité de prions devienne  
5 détectable.

L'étape de détection, facilitée par l'étape d'amplification, est effectuée par spectroscopie de fluorescence. Les protéines à détecter sont marquées à l'aide d'une sonde fluorescente, dont la présence se  
10 manifeste lorsque celle-ci est éclairée par une lumière de longueur d'onde caractéristique. Toutefois, cette technique engendre, le plus souvent, un bruit de fond non négligeable, du fait que les sondes peuvent s'associer à d'autres molécules que les prions à  
15 détecter.

Une technique plus élaborée, dite technique de corrélation de fluorescence, met en œuvre deux sondes fluorescentes qui émettent selon deux longueurs d'onde différentes et qui s'accrochent toutes deux  
20 symétriquement et spécifiquement sur les protéines PrP<sup>C</sup>, ces dernières se trouvant en concentration importante au sein des prions. On éclaire ensuite avec des faisceaux à deux longueurs d'onde différentes, un volume très petit du liquide contenant les prions à  
25 détecter et on détecte, de manière instationnaire, les deux émissions fluorescentes intenses dues à la présence de prions, qui constituent un agglomérat de protéines PrP normales ou infectieuses sur lesquelles sont accrochées les sondes fluorescentes. Toutefois, un  
30 bruit de fond subsiste, dû notamment à la présence de sondes fluorescentes n'ayant pu trouver de sites

d'adsorption spécifiques et à la présence de protéines normales PrP<sup>C</sup> isolées, auxquelles se sont accrochées des sondes fluorescentes.

5                   Ainsi, les techniques exposées, que ce soient celles inhérentes à la concentration avant détection de macromolécules telles que l'ADN ou d'agglomérats de molécules tels que les prions présentent toutes l'inconvénient majeur de ne pas  
10 permettre une concentration spécifique des macromolécules ou agglomérats à détecter, du fait que ces techniques peuvent générer des espèces, pouvant entraîner lors de la phase de détection un bruit de fond important.

15

#### EXPOSE DE L'INVENTION.

La présente invention a précisément pour objet de proposer un procédé de concentration de  
20 macromolécules ou d'agglomérats de molécules ou particules, qui permette notamment une concentration sélective desdites macromolécules ou desdits agglomérats, en vue d'une éventuelle détection en limitant autant que possible les bruits de fond, ou en  
25 vue d'une éventuelle purification d'un échantillon contenant lesdites macromolécules ou lesdits agglomérats.

Pour ce faire, la présente invention a pour  
30 objet un procédé de concentration sélective d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou

particules présent dans un échantillon liquide, dite première phase liquide, comprenant une étape d'adsorption spécifique de ladite macromolécule ou dudit agglomérat dans une couche interfaciale séparant  
5 l'échantillon d'une seconde phase liquide ou gazeuse, ladite couche interfaciale étant apte à fixer sélectivement ladite macromolécule ou ledit agglomérat.

Par couche interfaciale, on entend, selon l'invention, une zone quasi-bidimensionnelle assurant  
10 la séparation entre les deux phases précitées. Cette couche est localisée à la surface de l'échantillon liquide comprenant la macromolécule ou l'agglomérat à concentrer. De part ces propriétés spécifiques, cette couche est apte à fixer sélectivement ladite  
15 macromolécule ou ledit agglomérat et, du fait de son épaisseur infime, à concentrer ladite macromolécule ou ledit agglomérat.

De préférence, l'adsorption sélective est réalisée par la succession d'étapes suivantes :

20 - formation d'une dispersion stabilisée, à partir d'un milieu biphasique, ledit milieu comprenant ladite première phase liquide et ladite seconde phase liquide ou gazeuse, ces phases étant séparées par la couche interfaciale destinée à concentrer ladite  
25 macromolécule ou ledit agglomérat ; et

- résorption de la dispersion formée lors de l'étape précédente de façon à reformer ladite couche interfaciale.

Selon les techniques de formation de  
30 dispersion envisagées, la dispersion, selon

l'invention, peut être soit une mousse, soit une émulsion.

Généralement, l'étape de formation de la dispersion est effectuée par agitation mécanique du milieu biphasique ou par injection directement dans la première phase liquide surmontée de la couche interfaciale de jets capillaires gazeux ou liquides.

On note qu'une mousse désigne une dispersion comprenant un ensemble de bulles de gaz (typiquement d'air) coexistant avec un milieu liquide interstitiel, sous forme de minces films entre les bulles. Ce type de dispersion ménage ainsi une multitude d'interfaces liquide-gaz. La mousse, selon l'invention, peut être obtenue, par exemple, par agitation mécanique vigoureuse du milieu biphasique ou par injection au sein de ce milieu biphasique de jets capillaires gazeux (typiquement des jets d'air).

On note que, selon l'invention, une émulsion désigne une dispersion, dans laquelle la phase liquide contenant les molécules aptes à fixer la macromolécule ou l'agglomérat de molécules ou particules à concentrer est divisée en globules au sein de l'autre phase liquide du milieu biphasique, ladite autre phase constituant un milieu interstitiel. On forme ainsi une multitude d'interfaces liquide-liquide, et on augmente de ce fait considérablement la surface de contact entre les deux phases du milieu biphasique.

L'émulsion, au même titre que la mousse, peut être obtenue par agitation mécanique du milieu biphasique mais également par injection directe au sein

de la première phase liquide surmontée de la couche interfaciale de jets capillaires liquides ou gazeux.

Ainsi, selon l'invention, le fait de passer par une dispersion du type mousse ou émulsion pour  
5 assurer la concentration d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contribue à ménager une multitude de zones interstitielles entre l'échantillon liquide et la couche interfaciale, ce qui augmente considérablement la quantité de surface  
10 entre ces deux milieux et facilite, de ce fait, la fixation des macromolécules ou les agglomérats de molécules par la couche interfaciale dispersée. Cette fixation se fait dans des zones quasi-bidimensionnelles, du fait qu'elle a lieu au niveau des  
15 zones interstitielles, ce qui améliore grandement l'efficacité et le temps de capture des macromolécules à concentrer par la couche interfaciale..

Après résorption de la dispersion, on se retrouve, ainsi, en présence d'une couche interfaciale  
20 reformée concentrée en macrolécules ou agglomérats de molécules et d'une phase liquide correspondant à l'échantillon liquide dépourvu en tout ou partie desdites macromolécules ou desdits agglomérats.

L'avantage de la présente invention est  
25 donc de pouvoir concentrer rapidement et sans amplification, les macromolécules ou agglomérats et ceci de manière sélective.

Comme décrit précédemment, après capture  
30 des macromolécules ou agglomérat de molécules ou particules à concentrer, la dispersion est amenée à

subir une étape de résorption. Cette étape peut être menée de différentes manières. Par exemple, cette étape de résorption de la dispersion peut être effectuée par drainage des films interstitiels, dans le cas d'une  
5 mousse, ou du milieu interstitiel, dans le cas d'une émulsion. La cinétique de la résorption peut être contrôlée soit par un choix judicieux des molécules constitutives de la phase réceptrice des macromolécules ou agglomérats via la longueur des chaînes  
10 moléculaires, par exemple, soit à l'aide d'un cisaillement mécanique de la dispersion.

Selon un mode avantageux, la couche interfaciale comprend au moins une molécule apte à  
15 fixer sélectivement les macromolécules ou les agglomérats de molécules ou particules en question.

Selon l'invention, la molécule apte à fixer la macromolécule ou agglomérat de molécules ou particules à concentrer peut être une molécule  
20 surfactante comportant des groupements aptes à fixer la macromolécule ou ledit agglomérat par affinité chimique, polarisation électrique ou magnétique, et/ou ionisation.

Si ladite molécule n'est pas mélangée avec  
25 d'autres molécules surfactantes, ladite molécule peut être également, en outre, une molécule stabilisatrice de la dispersion formée au cours d'une des étapes du procédé.

Dans ce cas, la molécule assure une double  
30 fonction, qui est de fixer la macromolécule ou l'agglomérat à concentrer et également d'assurer la

stabilisation de la dispersion, contribuant ainsi à augmenter le temps de contact au niveau des zones interstitielles entre molécules attractives et macromolécules ou agglomérats à concentrer.

5

Le procédé selon l'invention peut s'appliquer à la concentration de tout type de macromolécules ou d'agglomérats.

10 A titre d'exemples, on peut citer comme macromolécules pouvant être concentrées, selon le procédé de l'invention, les acides nucléiques, les protéines telles les anticorps.

15 A titre d'exemples, on peut citer comme agglomérats de molécules pouvant être concentrés, selon le procédé de l'invention, les prions.

A titre d'exemples, on peut citer comme agglomérats de particules pouvant être concentrés des particules colloïdales telles que des particules d'or.

20 Ainsi, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre pour la concentration d'un acide nucléique particulier, qui est l'ADN.

Dans le cas de l'ADN, la molécule apte à fixer l'ADN est, par exemple, une molécule fonctionnalisée par une sonde de façon à permettre 25 l'hybridation spécifique de l'ADN à concentrer, par exemple, un lipide fonctionnalisé par un ADN complémentaire de l'ADN à concentrer.

30 Le fait que la molécule soit un lipide est particulièrement intéressant dans le cadre de cette invention, car cette catégorie de molécules contribue à assurer la stabilisation de la dispersion formée. De



plus, la fonctionnalisation de cette molécule par un ADN complémentaire de l'ADN à concentrer permet une concentration et une extraction sélective dudit ADN.

A titre d'exemples, on peut citer, comme  
5 lipides fonctionnalisés efficaces dans la concentration d'ADN, des lipides biotinylés comportant un groupement avidine ou dérivé de l'avidine, sur lequel est greffé l'ADN complémentaire par une extrémité biotinylée précédemment incorporée audit ADN complémentaire ou  
10 encore des lipides cationiques comprenant au moins un groupement spermine sur lequel est adsorbé l'ADN complémentaire. De tels lipides cationiques peuvent être des lipides du type DOGS ou Diocadécylamidoglycylspermine, commercialisé sous la  
15 marque Transfectam™. Ces lipides présentent deux chaînes carbonées saturées en C<sub>18</sub> ainsi qu'une tête polaire constituée d'un groupement spermine présentant une forte affinité pour l'ADN. L'ADN complémentaire est ainsi adsorbé sur les sites spermine. Les lipides  
20 résultant constituent de véritables sondes fonctionnalisées permettant l'hybridation spécifique des ADN à concentrer, dit 'ADN cibles'.

Le procédé selon l'invention peut également être utilisé pour la concentration d'agglomérats de  
25 molécules, tels que les prions. Ces derniers sont naturellement hydrophobes, de sorte qu'avec un système biphasique eau/air, l'eau correspondant à l'échantillon liquide (ou première phase liquide) contenant les prions à concentrer et l'air à la deuxième phase, ils  
30 s'adsorbent naturellement à l'interface eau/air, ladite

interface correspondant selon la terminologie de l'invention, à la couche interfaciale.

Le procédé selon l'invention peut également être utilisé pour la concentration de particules colloïdales. Celles-ci peuvent être, par exemple, des  
5 particules submicroniques d'or solubilisées dans l'eau (correspondant selon la terminologie de l'invention à la première phase liquide). Les molécules aptes à fixer ces particules colloïdales d'or, contenues dans la  
10 couche interfaciale, sont, par exemple, des molécules portant des groupements thiol -SH concentrées dans la couche interfaciale.

Le procédé de concentration, explicité ci-dessus, sert, comme son nom l'indique, à concentrer  
15 sélectivement dans une couche interfaciale une macromolécule ou un agglomérat de macromolécules donné. Il peut, de ce fait, être mis en œuvre, afin de purifier, de détecter ou d'amplifier la macromolécule ou un agglomérat de molécules ou particules donné.

20 Ainsi, la présente invention a également pour objet un procédé de purification d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules contenu initialement dans un échantillon liquide, comprenant la concentration de ladite  
25 macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche interfaciale par la mise en œuvre du procédé de concentration décrit précédemment suivie de l'élimination de l'échantillon liquide appauvri en ladite macromolécule ou ledit agglomérat, après l'étape  
30 de concentration.

Par exemple, ce procédé trouve son application dans le cas de la purification d'ADN. Dans ce cas, le procédé selon l'invention consiste à partir de molécules fonctionnalisées par un ADN complémentaire  
5 spécifique, à extraire spécifiquement un ADN cible, à partir d'un échantillon liquide comprenant, par exemple, un mélange de divers ADN ou diverses portions d'ADN, ledit échantillon étant ensuite éliminé.

Ce procédé peut également trouver son  
10 application dans la purification de protéines. La capture sélective de protéines via la couche de lipides fonctionnalisés, suivi d'une étape ultérieure de cristallisation desdites protéines peut permettre d'isoler ces protéines afin d'en étudier leur structure  
15 ou bien permettre de purifier une solution de la protéine en question.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'une macromolécule ou  
20 d'un agglomérat de molécules ou particules contenu initialement dans un échantillon liquide comprenant la concentration au sein d'une couche interfaciale de ladite macromolécule ou dudit agglomérat par la mise en oeuvre du procédé de concentration décrit  
25 précédemment suivie de la détection de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche par des techniques appropriées de détection.

Ainsi, lorsque la macromolécule est de l'ADN, la détection de l'ADN, après concentration  
30 sélective, peut se faire par fluorescence excitée par laser ou en détectant la variation du potentiel

électrique de surface au niveau de la couche fonctionnalisée, ou encore par une technique de rhéologie interfaciale. Les performances de la détection par fluorescence ou électrique peuvent être  
5 notamment améliorées en comprimant par un procédé mécanique ou hydrodynamique la couche interfaciale contenant les ADN ciblés hybridés en un point de l'interface (au centre, par exemple) coïncidant avec le volume laser d'excitation ou bien avec la présence  
10 d'une sonde électrique.

Enfin, la présente invention a également pour objet un procédé d'amplification d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou  
15 particules contenu initialement dans un échantillon liquide comprenant la concentration de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein d'une couche interfaciale par la mise en oeuvre du procédé de concentration décrit précédemment, le remplacement  
20 dudit échantillon liquide, après l'étape de concentration de ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche, par un liquide comprenant des agents d'amplification, suivie de l'étape d'amplification au moyen desdits agents.

25 Ainsi, lorsque le procédé d'amplification s'applique à l'ADN, après concentration des segments d'ADN cibles dans la couche interfaciale, l'échantillon liquide appauvri en ces segments est soutiré et remplacé par un liquide purifié contenant des agents  
30 d'amplification tels que la polymérase et des désoxyribonucléotides. La phase d'amplification par PCR

peut être alors réalisée sans la présence de segments d'ADN parasites et le bruit de fond de la PCR s'en trouve considérablement réduit.

5                    Par exemple, lorsque le procédé d'amplification s'applique à des agglomérats de molécules tels que les prions, après concentration des prions dans une couche interfaciale donnée, selon le procédé de concentration décrit, précédemment,  
10 l'échantillon liquide appauvrie en lesdits prions peut être soutirée et remplacée par un liquide pur contenant des agents d'amplification tels que des protéines normales PrP<sup>C</sup> non encore transformées. Ensuite, les étapes classiques de la PMCA (sonication, ...) peuvent  
15 être mises en œuvre sans être gênées par des molécules parasites.

                  Ce procédé d'amplification peut être suivi d'une détection ultra-sensible, par exemple, par corrélation de fluorescence, effectuée conjointement ou  
20 non à la PMCA. Par cette technique, on peut améliorer les performances de la détection en concentrant, à l'aide d'un procédé mécanique ou hydrodynamique, les prions localement en un point de la couche interfaciale qui coïncide avec le volume de mesure laser ou bien  
25 avec la présence d'une sonde électrique.

                  D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description du mode de réalisation particulier qui suit, en référence aux dessins annexés.

**BREVE DESCRIPTION DES FIGURES.**

La figure 1 représente les différentes étapes, pour arriver à la concentration d'un ADN cible, selon un mode particulier de réalisation du procédé de concentration selon l'invention.

La figure 2 représente une vue détaillée d'un film interstitiel créé lors de la formation d'une mousse.

Les figures 3, 4 et 5 représentent des procédés de purification, de détection et de concentration mises en œuvre après le procédé de concentration explicité sur la figure 1.

**EXPOSE D'UN MODE PARTICULIER DE REALISATION DE L'INVENTION.**

La figure 1 représente, à titre illustratif et non limitatif, la mise en œuvre, en quatre étapes (a), (b), (c) et (d), du procédé selon l'invention pour la concentration d'un ADN cible.

L'étape (a) de la figure 1 représente un microbêcher 10, dans lequel est déposé, à l'aide d'une micropipette ou d'une seringue, un échantillon liquide 12 contenant l'ADN cible 14, représenté sur la figure sous forme de brins. Ledit échantillon 12 est surmonté d'une deuxième phase 11, correspondant à l'air ambiant.

Au cours de l'étape intitulée (b) sur la figure 1, une monocouche 16 comprenant un mélange de lipides ligands 18 et de lipides diluants 17 (rapport lipides ligands/lipides diluants 1 :4) est déposée à la surface de l'échantillon liquide 12. Cette monocouche 16 correspond, selon la terminologie de l'invention, à

une couche interfaciale. Ces lipides ligands 18 sont tels que les ADN cibles vont pouvoir s'hybrider avec lesdits lipides. Pour cela, ces lipides doivent, au cours d'une étape préliminaire, être fonctionnalisés.

5 Ainsi, les lipides ligands peuvent être des lipides initialement biotinylés, du type biotine-(LC)-DPPE, sur lesquels on adsorbe dans un premier temps de l'avidine puis dans un deuxième temps l'on greffe l'ADN complémentaire de l'ADN cible, sur l'avidine par le

10 biais d'un groupement biotine fixé sur l'une des extrémités de l'ADN complémentaire. L'ensemble (lipide biotinylé-Avidine-ADN complémentaire biotinylé) constitue un lipide fonctionnalisé par une sonde permettant une hybridation spécifique des brins d'ADN

15 cible.

Les lipides peuvent être également des lipides cationiques comprenant au moins une extrémité spermine, sur laquelle est adsorbée un ADN complémentaire de l'ADN cible à concentrer.

20 Il est bien entendu que les molécules aptes à fixer de l'ADN cible peuvent s'étendre à tout type de molécules aptes à fixer sélectivement l'ADN cible.

Conformément à l'invention et comme

25 l'illustre l'étape (c) de la figure 1, une dispersion du type mousse est créée par injection d'air dans l'échantillon liquide, ladite mousse étant constituée d'un ensemble de bulles, maintenu en cohésion par des films liquides interstitiels. La stabilité temporaire

30 de la mousse est assurée par les lipides constitutifs de la phase sous forme de monocouche 16.

Une vue détaillée d'un film liquide interstitiel constitutif de la dispersion de type mousse est représentée sur la figure 2. Sur cette figure, ce film présente une forme octaédrique 22 de  
5 très faible volume, au sein duquel coexistent l'échantillon liquide 12 et la monocouche 16 ou couche interfaciale. De ce fait, l'ADN cible 14 se trouve quasiment en contact direct avec les lipides fonctionnalisés 18 de la monocouche ou couche  
10 interfaciale et se trouve ainsi très vite adsorbé par ces lipides 18. Le fait de passer par une mousse multiplie l'efficacité et la cinétique de capture de l'ADN par les lipides, du fait du très faible volume des films insterstitiels constitutifs de la mousse.

15 Enfin, au cours d'une ultime étape représentée en (d) de la figure 1, la mousse est résorbée, laissant place à nouveau à un milieu biphasique non dispersé comprenant la monocouche de lipidique 24, de très faible épaisseur, au niveau de  
20 laquelle s'est adsorbé les ADN cibles sur les lipides hybridés 19, cette monocouche correspondant à une couche interfaciale référencée 24 sur le dessin et une phase 26 correspondant à l'échantillon liquide 12 appauvri en ADN cible. Il est bien entendu, que, sur  
25 l'ensemble de la figure 1, les lipides 17, 18 et 19 ne devraient être localisés uniquement qu'au niveau de la monocouche 16 ou couche interfaciale 24 (pour la figure 1d), d'épaisseur infime. Toutefois, pour des raisons de visibilité, lesdits lipides ont été  
30 considérablement grossis.



Les figures 3, 4 et 5 illustrent différentes applications envisageables du procédé de concentration, mises en œuvre selon un mode de réalisation particulier décrit ci-dessus.

5           Ainsi, la figure 3 illustre le cas où, après concentration desdits ADN cibles, par le procédé explicité sur la figure 1, lesdits ADN sont détectés par des techniques de fluorescence. Dans ce cas, les lipides 19 fonctionnalisés par un ADN complémentaire de  
10 l'ADN cible et hybridés, comportent, en plus, un marqueur fluorescent. Ainsi, on peut déterminer la présence d'ADN cible au niveau de la couche interfaciale 24 par une mesure de fluorescence.

La figure 4 illustre un cas particulier de  
15 purification d'un ADN préalablement concentré, par le procédé de concentration explicité selon la figure 1. Une fois que la résorption de la mousse est achevée, la phase 26 appauvrie en ADN, ledit ADN étant adsorbé, en majeure partie sur la couche 24, est soutirée à l'aide  
20 d'une micropipette 23 et l'on obtient une couche interfaciale 24 d'ADN purifié.

La figure 5 illustre le cas où le procédé de concentration est utilisé dans le seul but d'obtenir une phase plus concentrée en un ADN donné que la phase  
25 d'origine dudit ADN. A ce moment-là, la couche 24 riche en ADN cible est soutirée à l'aide d'une micropipette 23 pour être utilisée pour des applications diverses.

Il est bien entendu, que d'autres applications, non représentées sur ces figures, peuvent  
30 être envisagées.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de concentration sélective d'une macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou particules présent dans un échantillon liquide, dite  
5 première phase liquide, comprenant une étape d'adsorption spécifique de ladite macromolécule ou dudit agglomérat dans une couche interfaciale séparant l'échantillon d'une seconde phase liquide ou gazeuse, ladite couche interfaciale étant apte à fixer  
10 sélectivement ladite macromolécule ou ledit agglomérat.

2. Procédé de concentration sélective selon la revendication 1, dans lequel l'adsorption spécifique est réalisée par la succession d'étapes suivantes :

15 - formation d'une dispersion stabilisée, à partir d'un milieu biphasique, ledit milieu comprenant ladite première phase liquide et ladite seconde phase liquide ou gazeuse, ces phase étant séparées par la couche interfaciale destinée à concentrer ladite  
20 macromolécule ou ledit agglomérat ; et

- résorption de la dispersion formée lors de l'étape précédente de façon à reformer ladite couche interfaciale.

25 3. Procédé de concentration selon la revendication 2, dans lequel la dispersion est une mousse ou une émulsion.

30 4. Procédé de concentration selon la revendication 2 ou 3, dans lequel l'étape de formation

de la dispersion est effectuée par agitation mécanique du milieu biphasique.

5. Procédé de concentration selon la  
5 revendication 2 ou 3, dans lequel l'étape de formation de la dispersion est effectuée par injection directement dans la première phase liquide surmontée de la couche interfaciale de jets capillaires gazeux ou liquides.

10

6. Procédé de concentration selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la couche interfaciale comprend au moins une molécule apte à fixer ladite macromolécule ou ledit agglomérat.

15

7. Procédé de concentration selon la revendication 6, dans lequel la molécule apte à fixer la macromolécule ou agglomérat de molécules ou particules à concentrer est une molécule surfactante  
20 comportant des groupements aptes à fixer la macromolécule ou agglomérat par affinité chimique, polarisation électrique ou magnétique, et/ou ionisation.

25

8. Procédé de concentration selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel la macromolécule est choisie parmi le groupe constitué par les acides nucléiques et les protéines.

9. Procédé de concentration selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'agglomérat de molécules est un prion.

5 10. Procédé de concentration selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel l'agglomérat de particules est choisi parmi le groupe constitué de particules colloïdales.

10 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel la macromolécule à concentrer est l'ADN.

15 12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel la molécule apte à fixer l'ADN est fonctionnalisée par une sonde de façon à permettre l'hybridation spécifique de l'ADN à concentrer.

20 13. Procédé selon la revendication 11, dans lequel la molécule apte à fixer l'ADN est un lipide fonctionnalisé par une sonde ADN complémentaire de l'ADN à concentrer.

25 14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le lipide est un lipide biotinylé comportant un groupement avidine ou dérivé de l'avidine, sur lequel est greffé l'ADN complémentaire par une extrémité biotinylée précédemment incorporée audit ADN.

30 15. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le lipide est un lipide cationique comprenant au

moins un groupement spermine sur lequel est adsorbé l'ADN complémentaire.

16. Procédé de purification d'une  
5 macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou  
particules contenu initialement dans un échantillon  
liquide, comprenant la concentration de ladite  
macromolécule ou dudit agglomérat au sein d'une couche  
par la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque  
10 des revendications 1 à 8, l'élimination de  
l'échantillon liquide appauvri en ladite macromolécule  
ou ledit agglomérat, après l'étape de concentration.

17. Procédé de détection d'une  
15 macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou  
particules contenu initialement dans un échantillon  
liquide comprenant la concentration au sein d'une  
couche de ladite macromolécule ou dudit agglomérat par  
la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des  
20 revendications 1 à 8 et la détection de ladite  
macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite  
couche par des techniques appropriées de détection.

18. Procédé d'amplification d'une  
25 macromolécule ou d'un agglomérat de molécules ou  
particules contenu initialement dans un échantillon  
liquide comprenant la concentration de ladite  
macromolécule ou dudit agglomérat au sein d'une couche  
par la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque  
30 des revendications 1 à 8 et le remplacement dudit  
échantillon liquide, après l'étape de concentration de

ladite macromolécule ou dudit agglomérat au sein de ladite couche, par un liquide comprenant des agents d'amplification, suivie de l'étape d'amplification au moyen desdits agents.

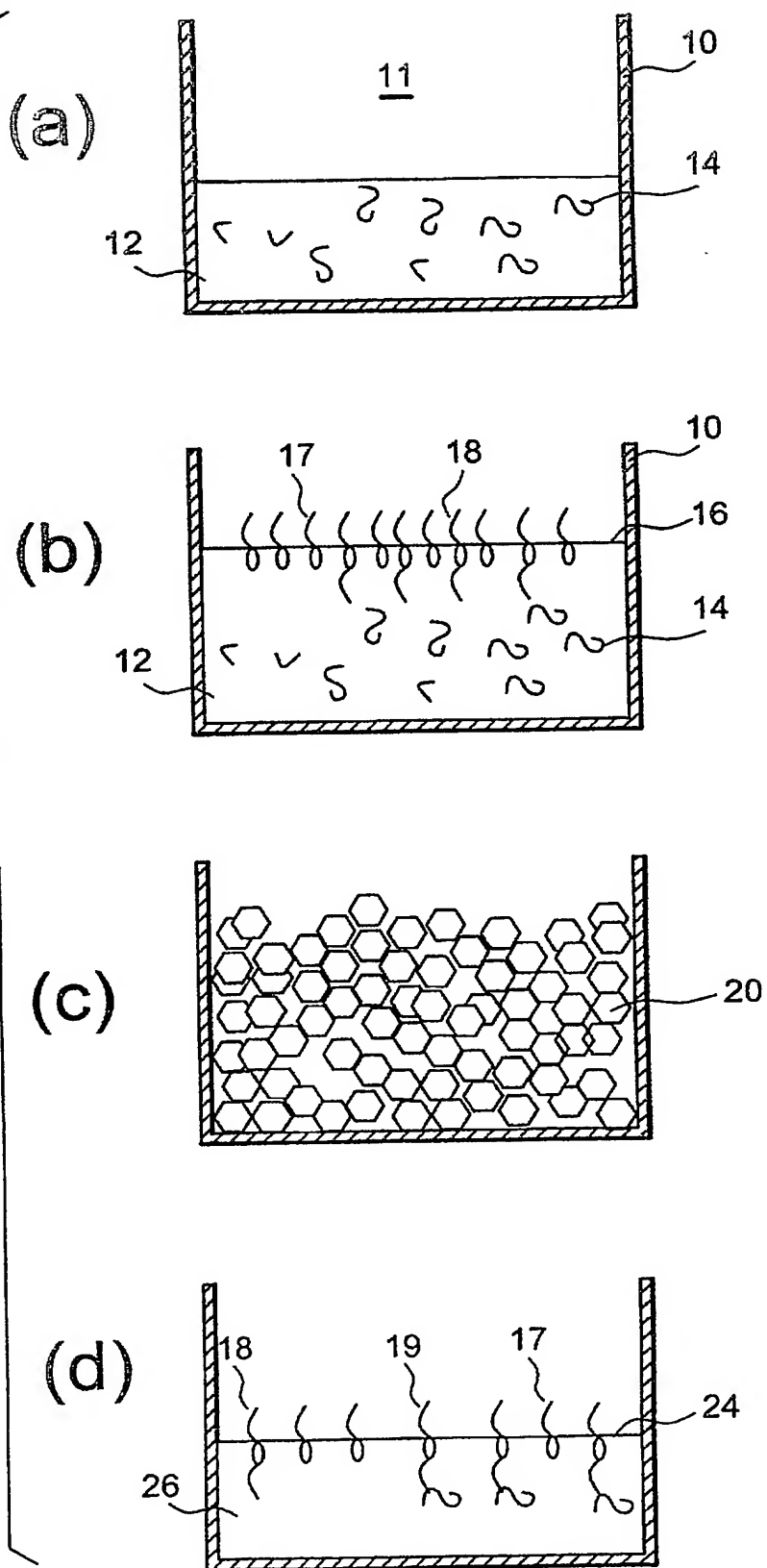
5

19. Procédé d'amplification selon la revendication 18, dans lequel la macromolécule est un ADN.

10

20. Procédé d'amplification selon la revendication 18, dans lequel l'agglomérat de molécules est un prion.

FIG. 1



2 / 2

FIG. 2

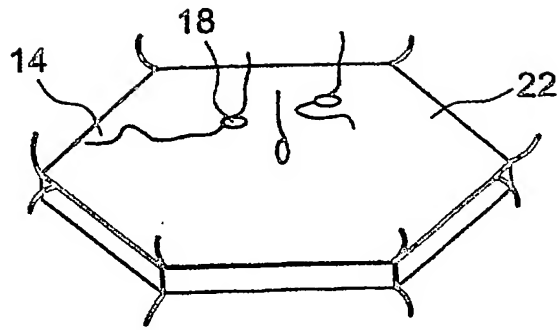


FIG. 3

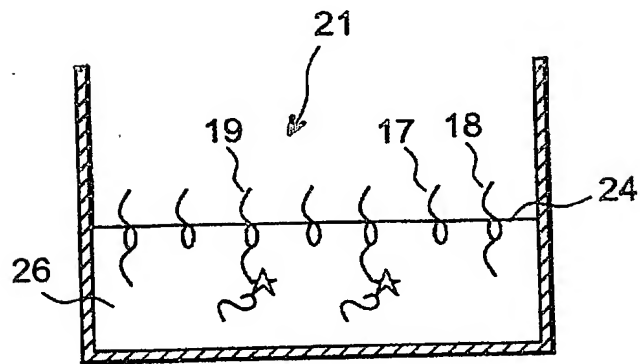


FIG. 4

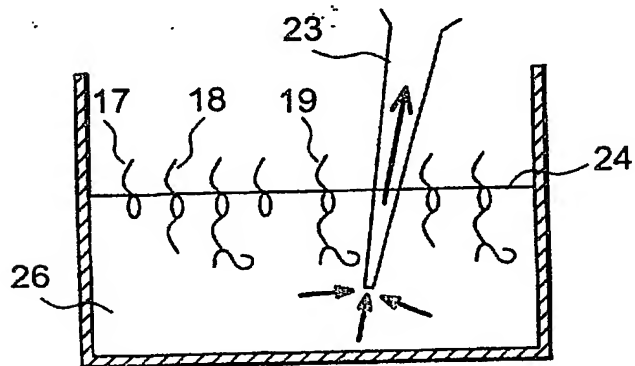
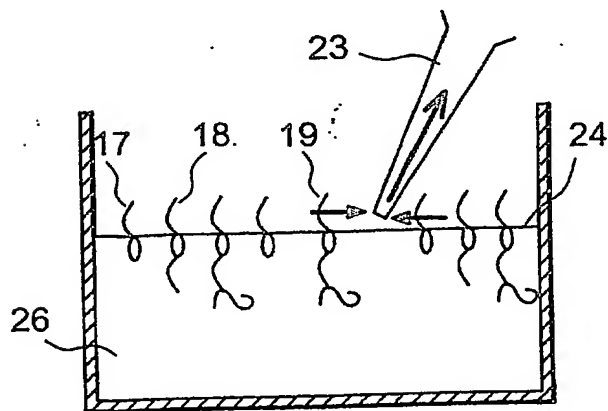


FIG. 5





DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B14051.3/FG DD 2319	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02.03690 du 25.03.2002	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE CONCENTRATION DE MACROMOLÉCULES OU AGGLOMERATS DE MOLECULES OU PARTICULES.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3 rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		BERTHIER	
<b>Prénoms</b>		Jean	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	8 rue des Florentines	
	<b>Code postal et ville</b>	38240	MEYLAN
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		DAVOUST	
<b>Prénoms</b>		Laurent	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	40 rue Claude Genin	
	<b>Code postal et ville</b>	38100	GRENOBLE
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>			
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>		
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 4 AVRIL 2002 F.GUERRE 422-5/002			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**